

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-146983

(43)Date of publication of application : 26.05.2000

(51)Int.Cl.

G01N 33/68

C07K 17/08

(21)Application number : 11-349044

(71)Applicant : CITY OF HOPE

(22)Date of filing : 21.06.1991

(72)Inventor : BAILEY JEROME M

(30)Priority

Priority number : 90 576943 Priority date : 13.08.1990 Priority country : US

(54) DECOMPOSITION FOR CONTINUOUS C-TERMINAL OF PEPTIDE AND PROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new C-terminal peptide splitting reagent which contains a lower trialkylsilanol alkaline metal salt and a trialkylamine N-oxide by a constitution wherein the N-terminal of a peptide sample is covalent-bonded to an activation PE-COOH solid phase.

SOLUTION: A splitting agent is used in methanol, triethylsilylethanol or similar alcohol or in a solvent in a wider range in the case of a triethylamine N-oxide at a molar concentration of about 0.1 to about 0.2. A splitting reaction contains the formation of an unstable C-terminal trimethylsilylester. A C-terminal carboxyl group is reformed quickly under the existence of the ester, water or alcohol. In addition, a splitting agent which is expressed by a formula of R_3SiO-X^+ (where R represents a hydrocarbon residue and X represents alkali metal ions) is contained. A support contains a nonporous polyethylene film which is modified by an activation carboxylic acid. The thickness range of a PE-COOH film is to be hydrophobic at 0.5 to 2.0 mil.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 08.12.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3124273

[Date of registration] 27.10.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right] 27.10.2003

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-146983

(P2000-146983A)

(43) 公開日 平成12年5月26日 (2000.5.26)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

キーワード (参考)

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/68

C 0 7 K 17/08

C 0 7 K 17/08

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平11-349044
(62) 分割の表示 特願平3-511789の分割
(22) 出願日 平成3年6月21日 (1991.6.21)

(31) 優先権主張番号 5 7 6 9 4 3
(32) 優先日 平成2年8月13日 (1990.8.13)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 598004424
シティ・オブ・ホープ
City of Hope
アメリカ合衆国カリフォルニア州91010-
0269, デュアーテ, イースト・デュアー
テ・ロード 1500
(72) 発明者 ベイリー, ジェローム・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州91010,
デュアーテ, フィッシュ・キャニオン・ブ
ールバード 3262
(74) 代理人 100089705
弁理士 社本 一夫 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド及び蛋白質の連続C末端分解

(57) 【要約】

蛋白質およびペプチドのC末端配列決定に有用な試薬が開示されている。この試薬は、ソジウム・トリメチルシラノレートおよびトリメチル・N-オキシドを包含する。C末端配列決定すべきペプチドサンプルのための、誘導体化され活性化されたポリエチレン支持体が記載されている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (i) 表面にカルボキシル基を有するポリエチレン膜；

(ii) 前記ポリエチレン膜の表面のカルボキシル基にアミド結合によりカップリングされたリンカーであって、該カップリングの前には次式： $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ （式中、 n は4ないし10の数である）で表されるリンカー；からなり、該リンカーのカルボン酸は2-フルオロ-1-メチルピリジンとの反応でエステル化されている、活性化されたカルボン酸で修飾されたポリエチレン膜。

【請求項2】 カルボン酸修飾ポリエチレン膜をDCC、CDI、EDC、BOP、DICまたは2-フルオロ-1-メチルピリジンと反応させることよりなる、C末端から配列決定すべきペプチドのN末端と共有結合させるために、カルボン酸修飾ポリエチレン膜のカルボキシル基を活性化エステルに変換する方法。

【請求項3】 請求項2の方法で製造された活性化カルボン酸及び修飾ポリエチレン膜。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は1990年5月18日に出願されたPCT/US90/02723号の一部継続出願である1990年8月13日に出願されたベイリー（Bailey）の米国出願07/576,943号の一部継続出願であり、両出願は参照により本明細書に含まれる。

【0002】発明の分野

本発明はカルボキシ末端からのペプチド及び蛋白質の連続分解に関する。より詳細には、本発明は、カルボキシ末端配列決定方法においてカップリング剤としてシリルイソチオシアネートを用いたことにより達成された、誘導体化ペプチドからのC-末端チオヒダントインアミノ酸の開裂方法に関する。本発明はまた、配列決定すべきペプチドの共有結合による固定化のための誘導体化され及び活性化された支持体にも関する。

【0003】発明の背景

A. 背景

蛋白質及びペプチドのカルボキシ末端からの連続的分解方法の開発は、いくつもの研究の目的とされた。ワード（Ward），C. W. の *Practical Protein Chemistry-A Handbook*（ダーブル（Darbre），A. 編集）（1986）及びランガラジャン（Rangarajan），M. の *Protein/Peptide Sequence Analysis: Current*（1988）を参照。そのような方法はエドマン法による現存のN末端分解法を補足する。エドマン（Edman），P.， *Acta Chemica Scandinavica*，4: 283-293（1950）。もっとも広く研究され及びおそらくそのエドマン分解法との類似性のために簡便でもっとも魅力的な方法は、アミノ酸をチオヒダントインに変換する方法である。この反応は、ジョンソン及び

ニコレ（Johnson and Nicolet）により *J. Am. Chem. Soc.*，33: 1973-1978（1911）に最初に観察されたが、蛋白質のカルボキシ末端からの連続的分解に最初に応用したのはシュラック及びカンパ（Schlack and Kumpf）である（*Z. Physiol. Chem.*，154: 125-170（1926））。これらの著者は、酢酸及び無水酢酸に溶解したチオシアン酸アンモニウムを、N-ベンゾイル化ペプチドと反応させてカルボキシ末端に1-アシル-2-チオヒダントインを形成した。このアミノ酸チオヒダントインを遊離させて新たなカルボキシ末端アミノ酸を生じさせるためには、強塩基への暴露が用いられた。この方法の主な欠点は、C末端アミノ酸の誘導体化を完成させるのに要する条件、及びその後ペプチジルチオヒダントイン誘導体をあらたな短縮ペプチドとアミノ酸チオヒダントイン誘導体に開裂させるために要する条件が過酷であることである。

【0004】この仕事は報告されて以来、多くのグループが要求される条件、特にペプチジルチオヒダントインの開裂に要求される条件の過酷性を減少させて、この化学反応を蛋白質のカルボキシ末端から連続的に分解するために応用する試みを行った。シュラック及びカンパにより最初に用いられたよりも低い水酸化ナトリウム濃度及び水酸化バリウム濃度がペプチジルチオヒダントインの開裂に有効であることが見出された。ウェイリー（Waley），S. G. ら， *J. Chem. Soc.*，1951: 2394-2397（1951）；クジェール（Kjaer），A. ら， *Acta Chemica Scandinavica*，6: 448-450（1952）；ターナー（Turner），R. A. ら， *Biochim. Biophys. Acta*，13: 553-559（1954）。他のグループは、アミノ酸チオヒダントインの脱アシル化のために、ジョンソン及びニコレが用いた最初の方法に基づいて酸性条件を用いた。チップス（Tibbs），J.， *Nature*，168: 910（1951）；バプチスト（Baptist），V. H. ら， *J. Am. Chem. Soc.*，75: 1727-1729（1953）を参照。これらの著者は、ペプチジルチオヒダントイン結合の開裂を行うために濃塩酸をカップリング溶液に添加した。水酸化物がチオヒダントインアミノ酸の分解を生じることが示されているのとは異なり、塩酸はチオヒダントインアミノ酸の分解を生じないことが示された。スコッフオン（Scoffone），E. ら， *Ric. Sci.* 26: 865-871（1956）；フォックス（Fox），S. W. ら， *J. Am. Chem. Soc.*，77: 3119-3122（1955）；スターク（Stark），G. R.， *Biochem.* 7: 1796-1807（1968）参照。クロムウェル（Cromwell），L. D. ら， *Biochem.* 8: 4735-4

740 (1969) は、濃塩酸は室温でチオヒダントインアミノ酸を開裂するために用いることができることを示した。この方法のおもな欠点は、蛋白質に適用した時、2または3サイクルより多く実行できないことである。

【0005】ヤマシタ (Yamashita), S., *Biochem. Biophys. Acta*, 229: 301-309 (1971) は、プロトン化陽イオン交換樹脂を用いて、繰り返しペプチジルチオヒダントインの開裂が可能であることを発見した。この方法を $100 \mu\text{mo}$ l 量のババイン及びリボヌクレアーゼに適用したところ、それぞれ14及び10サイクルが可能であったと報告されているが、その詳細は記載されていない。ヤマシタ (Yamashita), S. ら, *Proc. Hoshi. Pharm.* 13: 136-138 (1971) を参照。スターク (Stark) は、ある種の有機塩基、例えばモルホリンまたはピペリジンを水酸化ナトリウムの代わりに使用できることを報告し、そして同様の考えに沿って、クボ (Kubo), H. ら, *Chem. Pharm. Bull.*, 19: 210-211 (1971) は、トリエチルアミン水溶液 (0.5M) がペプチジルチオヒダントインの開裂に有効に用いられ得ることを報告した。スターク (Stark) は、開裂剤として pH 8.2 のピリジン水溶液中のアセトヒドロキサム酸を導入することにより、開裂の問題を解決した様に見えた。この試薬は室温及び穏和な pH でペプチジルチオヒダントインを迅速且つ特異的に開裂することが示された。

【0006】ペプチジルチオヒダントインの形成のための条件は、スターク及びドゥレット (Dwulet), F. E. ら, *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 13: 122-129 (1979) により (これらの著者らは、チオシアン酸塩でなく、チオシアン酸の使用について報告した) 改良され、より最近ではカップリング剤としてトリメチルシリルイソチオシアネート (TMS-ITC) の導入により改良された。ホーク (Hawke), D. H. ら, *Anal. Biochem.*, 166: 298-307 (1987) 参照。この試薬の C-末端配列決定の用途は特許されている。ホーク (Hawke) の米国特許 4,837,165 参照。この試薬はペプチジルチオヒダントイン形成の収率を非常に向上させ、そして複雑な副生成物の数を減少させた。12N HCl による (ホーク, 1987) およびアセトヒドロキサメートによる (ミラー (Miller), C. G. ら, *Techniques in Protein Chemistry* (フグリ (Hugli), T. E. 編集), 67-68 頁, アカデミックプレス (1989)) ペプチジルチオヒダントインの開裂は、数サイクルの分解以上は不可能であった。

【0007】B. 開裂の問題

シュラック及びカンパ (Schlack and Kumpf) により 1926 年に最初に C-末端分解のためのチオシアネート化学反応法が提唱されて以来、開裂反応は精力的に研究されてきたが、分解の繰り返しを多くできる化学方法はいまだ報告されていない。シュラック及びカンパ (1926) により最初に提唱された 1N 水酸化ナトリウム中での開裂は、蛋白質およびペプチドの加水分解を、C-末端ペプチジルチオヒダントインの開裂以外に他の部位でも行うことが、よく知られている。遊離されたチオヒダントインアミノ酸誘導体は、水酸化物溶液中で不安定であることも知られている。上記スコフオン (Scoffone) 参照。水酸化物での開裂は、アスパラギンおよびグルタミン残基の側鎖アミド基をカルボキシル基に変換して、これらの基をそれぞれアスパラギン酸およびグルタミン酸から区別することを不可能にすることが知られている。

【0008】12N HCl でのペプチジルチオヒダントインの開裂を、蛋白質およびペプチドに適用すると、2または3サイクル以上は実施できなかった。上記クロムウェルおよび上記ホーク参照。その原因はおそらく、異なるアミノ酸側鎖を含むペプチジルチオヒダントインの加水分解の速度の相違、および他の内部アミド結合の加水分解によるものと考えられる。同様に、天然に存在するアミノ酸に相当する標準アミノ酸チオヒダントイン誘導体の合成の間に、12N HCl による N-アセチルチオヒダントインアミノ酸の脱アセチル化の速度は、アミノ酸の側鎖の性質に依存することが観察された。ベイリー (Bailey), J. M. ら, *Biochem.*, 29: 3145-3156 (1990)。

【0009】上記ヤマシタの樹脂を用いた開裂法を再度用いることが、上記ドゥレット (Dwulet) により試みられたが不成功であったと報告された。メタンスルホン酸水溶液中でのペプチジルチオヒダントインの開裂も、ドゥレットによりおよびベイリーらにより試みられたが、両者とも失敗した。メタンスルホン酸を選択した理由は、これがヤマシタ (1971) およびヤマシタら (1971) により採用された樹脂上の酸性基と均等であるためである。

【0010】上記スタークにより最初に報告されたようなアセトヒドロキサメートによるペプチジルチオヒダントイン誘導体の開裂は、短縮されたペプチドの C-末端に安定なヒドロキサメートエステルを形成することが見いだされた (上記ベイリーら)。採用される条件によるが、68%ないし93%のペプチドが C-末端で誘導体化され、そのためそれ以上の配列決定を阻害した。上記スタークはそのようなヒドロキサメートエステルが開裂の間の中間体として形成されることは予測したが、該エステルは開裂または連続配列決定に用いられる条件下で分解するであろうと考えたのである。アセトヒドロキサ

メートでの開裂により形成されるペプチジルヒドロキサメートエステルは、スチーグリッツ (Stieglitz), J. ら, J. Am. Chem. Soc., 36: 272-301 (1914) およびスコット (Scott), A. W. ら, J. Am. Chem. Soc., 49: 2545-2549 (1927) により研究されたヒドロキサメートエステルと同様に、チオヒダントイン形成に用いられる酸性条件下で安定であり、強塩基条件下においてのみ、加水分解されて配列決定を続行可能な遊離のペプチジルカルボキシル基を生じる。おそらくこのことが、上記スターク; ミュース (Meuth), J. L. ら, Biochem., 21: 3750-3757 (1982) および上記ミラーにおいて、開裂試薬としてアセトヒドロキサメート水溶液を採用したとき、繰り返し収率が低かった理由であろう。

【0011】トリエチルアミン水溶液によるペプチジルチオヒダントインの開裂は、最初にクボ (Kubo), H. ら, Chem. Pharm. Bull. 19: 210-211 (1971); 上記ドゥレットら; および上記ミュースらにより報告された。後者の研究グループは、トリエチルアミンが揮発性の面で自動配列決定のための開裂剤として有用であるとしているが、アセトヒドロキサメートによる開裂の方が明らかに好ましいため、トリエチルアミン法を採用しなかった。液相における2%トリエチルアミン水溶液でのペプチジルチオヒダントインの開裂は、迅速で(37℃および22℃において、それぞれハーフタイムが1分および5分である)、そして定量的であり、連続配列決定可能な短縮ペプチドおよびアミノ酸チオヒダントイン誘導体のみを生じることが見いだされた。上記ベイリーら。

【0012】C-末端配列決定の自動化には室温において、装置内のガラス瓶内での長期間(1ないし10日)の貯蔵が必要である。配列決定に使用する試薬はこの条件下で安定でなければならない。水中でのトリエチルアミンの貯蔵は、トリエチルアミンの急速な分解をもたらす。このような分解生産物は、第一および第二アミン類を含み、これらは次に短縮されたペプチドをさらに配列決定することを妨げる。トリエチルアミンの分解の間には遊離ラジカル化合物も生じる。そのような遊離ラジカル化合物はしばしばUV吸収性で、放出されたチオヒダントインアミノ酸を引続きHPLCで検出することを妨害する可能性が有る。出願人の経験ではトリエチルアミン水溶液(5%水溶液)を用いて自動化C-末端配列決定を行うと、常に60%より低い繰り返し収率しか得られず、このため、PVDFまたはポリエチレンの膜支持体に共有結合したペプチドで、C-末端分解は3回より多く行うことが出来なかった。

【0013】C-ペプチドサンプルの支持体
本発明の好ましいC-末端配列決定の実施においては、ペプチドサンプルは固体支持体に共有結合させる。出願

人および他の研究者(イングリスマ, Met. Protein Sequence Analysis (ジョルナバル/ホグ/グスタブソン, 編集) pp. 23-24, Birkhauser-Verlag, バーゼル (1991); ウィットマン-リーアオルドラ, Met. Protein Sequence Analysis (ジョルナバル/ホグ/グスタブソン, 編集) pp. 9-21, Birkhauser-Verlag, バーゼル (1991); ホークおよびボイド, Met. Protein Sequence Analysis (ジョルナバル/ホグ/グスタブソン, 編集) p. 35-45, Birkhauser-Verlag, バーゼル (1991)) は、C-末端配列決定はN-末端で固相へ共有結合したサンプルに適用するのが好ましいことを認識した。サンプルの固体支持体への固定は、サンプルの洗浄損失(ウォッシュアウト)を生ずることなく配列決定に最適の試薬と溶媒の使用を可能にし、サンプルを十分に洗浄して反応副産物を除去する可能性を与え(そうしないと該副産物は放出されたチオヒダントインアミノ酸の同定を妨害する可能性が有る)、さらには多くの液相法に伴う機械的ロスを防止する。一般に、自動化固相法は手動の液相法に比べて効率が良く且つ労力も要しないと期待されている。ラウルセン, R. A., J. Amer. Chem. Soc., 88: 5344-5346 (1966) によりN-末端蛋白質配列決定に固相法が導入されて以来、いくつかの異なるタイプの官能化支持体がポリペプチドサンプルの共有結合による固定化のために報告された。それらには、ポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂およびアミノアルキルもしくはアミノフェニル置換基をもつガラスビーズ支持体が含まれる(ラウルセンおよびマクライド, Methods Biochem. Anal. 26: 201-284 (1980); マクライト, Modern Methods in Protein Chemistry (シェシェ, H. 編集) pp. 262-302, デグライター, ベルリン/ニューヨーク (1983))。典型的には、これらのアミノ官能化支持体はフェニレンジイソチオシアネート(DITC)のような二官能性試薬により、蛋白質のカプリングのために活性化される。DITC基は、支持体およびペプチドのN-末端アミノ基もしくは側鎖リジンのイプリロンアミノ基に対して安定なチオウレアリンケージを形成することができる。近年、イソチオシアナト、アミノフェニルおよびアミノエチルアミノプロピル基で誘導体化したガラスビーズ(ソングーピング リアングおよびラウルセン, Anal. Biochem. 188: 366-373 (1990)), アミノフェニル基で官能化したガラス繊維シート(エーベルソルドラ, Anal. Biochem. 187: 56-65 (1990)), およびアリアルアミンおよびDITCで誘導体化したPVDF(ポリビニリ

デン・ジフルオリド) 膜 (バビンら, *Current Research in Protein Chemistry* (ピラフランカ, J. J. 編集) pp. 191-202, アカデミック・プレス社 (1990)) が、N-末端配列決定のためにポリペプチドの共有結合による固定化に用いられている。ポリペプチドの固定化は、確立されたDITC化学法により、リジンのイブシロンアミノ基と固体支持体のイソチオシアネート基の間のカップリングで、またはポリペプチドの活性化C-末端カルボキシル基とマトリックスのアミノ基とのカップリングで行われる。

【0014】固相におけるC-末端配列決定のためのチオシアネート化学法の適用を含む初期の多くの研究では、ペプチドサンプルの共有結合固定化のためにガラスビーズを使用していた (ウィリアムズおよびカサール, *FEBS Lett.* 54:353-357 (1975); ランガラジャンおよびダーブル, *Biochem. J.* 157:307-316 (1976); ミュースら, *Biochem.* 21:3750-3757 (1982); ホークら, *Anal. Biochem.* 166:298-307 (1987); イングリスら, *Methods in Protein Sequence Analysis* (ウィックマン・リープホルド, B. 編集) pp. 137-144, スプリングー・フェアラー (1989)。より最近の研究ではカルボン酸修飾されたPVDF (ベイリーおよびシベリー, *Techniques in Protein Chemistry: II* (ピラフランカ, J. J. 編集) pp. 115-129, アカデミック・プレス社 (1991)、DITC-活性化アミノPVDF (ミラーら, *Techniques in Protein Chemistry* (フグリ, T. E. 編集) pp. 67-78, アカデミック・プレス社 (1989)、イングリッスら, *Met. Protein Sequence Analysis* (ジョルンバール/ホーグ/グスタブソン編集) pp. 23-24, バークハウザー・フェアラー, バーゼル (1991))、およびジスクシンイミドイル カーボネート ポリアミド樹脂 (ホークおよびボイド, *Met. Protein Sequence Analysis* (ジョルンバール/ホーグ/グスタブソン編集) pp. 35-45, バークハウザー・フェアラー, バーゼル (1991)) の使用が含まれている。

【0015】C-末端配列決定のためにガラス支持体およびPVDF支持体を用いることには不利がある。ガラス支持体の誘導体化においてシロキサン結合が形成される。この結合は塩基にたいして不安定で、共有結合したペプチドサンプルの損失をもたらす。カルボキシ修飾PVDFおよびDITC-活性化アミノPVDFは、C-末端配列決定の工程の間に用いられる塩基性開裂試薬によりひきおこされるデヒドロフルオリネーションのた

め、物理的にも化学的にも好ましくない変化が生じる。これらの膜は各C-末端配列決定サイクルのたびに徐々に褐色化及び脆弱化する。

【0016】発明の概要

本発明は、(i) 低級トリアルキルシラノールのアルカリ金属塩および(ii)トリアルキルアミン・N-オキシドを含む、新規C-末端ペプチド開裂試薬を提供する。これらの新規開裂剤は、カップリング試薬としてシリル・イソチオシアネートが用いられる配列決定法において特に有用であるが、用途はこれに限定されるものではない。ソジウム・トリメチル・シラノレートおよびトリメチルアミン・N-オキシドが好ましい。本発明の好ましい実施においては、ペプチドサンプルのN-末端は活性化PE-COOH固相に共有結合されている。

【0017】発明の詳細な説明

アシルチオヒダントインの酸および塩基による加水分解のメカニズムは、コングドンおよびエドワード (Congdon and Edward), *Can. J. Chem.* 50:3767-3788 (1972) により詳細に研究されており、そして多くの開裂剤が上記スタークにより試験されている。スタークは、酸素を含有する親核剤がこの反応を行うために最適の試薬であることを見いだした。最初のアミノ酸に対してはアセトヒドロキサメートは優れた開裂剤であるが、これは安定で除去が困難なペプチジルヒドロキサメートエステルを形成し、そのため短縮されたペプチドがそれ以上配列決定されることを不可能にする。この試薬はまた、遊離されたチオヒダントインアミノ酸のHPLCによる同定を続ける際に、高いUV吸収バックグラウンドをもたらす。一般に、良好な親核剤でそのため良好な開裂剤である炭素系の試薬は、いずれも脱離基としての性質に乏しいものであり、そのために短縮されたペプチドの多くをそれ以上配列決定することから阻止すると思われる。

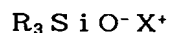
【0018】理想的には、開裂剤は次の特性を有する必要がある：(1) ペプチジルチオヒダントインを揮発性の水混和性有機溶媒中で開裂でき、これによりPVDF膜と水の不適合性の問題を解消できること；(2) 反応が迅速且つ特異的であること；(3) 短縮されたペプチドが連続的に分解できること；(4) 遊離されたチオヒダントインアミノ酸がこの試薬により破壊されないこと；および(5) この試薬は遊離されたチオヒダントインアミノ酸誘導体の検出に用いられる範囲の光を吸収しないこと。ペトラーチ (Petrarch) (Huls) から市販されているソジウム・トリメチルシラノレート (Fig. 1) は例えばアルコール性溶媒中で、およびアルドリッチ・ケミカル社 (Aldrich Chemical Co.) から市販されているトリメチルアミン・N-オキシド (Fig. 2) はアルコール性およびより広範な溶媒中で、上記の全ての性質を有するようである。100%メタノールまたはトリメチルシリルエタノ

ール中の0.05Mソジウムトリメチルシリノレート溶液による液相でのペプチジルチオヒダントインの開裂は、5分より短時間で完了する。メタノールまたはトリメチルシリルエタノール中の0.05Mソジウム・トリメチルシリノレート溶液は、液相および固相のいずれにおいても、ペプチジルチオヒダントインの開裂を5分より短時間で行う。

【0019】より詳細には、本発明は上記本発明の開裂剤を、メタノールまたはトリメチルシリルエタノールまたは類似のアルコール中で、あるいはトリメチルアミン・N-オキシドの場合にはより広範な溶媒中で、約0.025モルないし約0.25モル、好ましくは約0.1ないし約0.2モルの濃度で使用する。

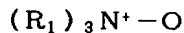
【0020】この開裂反応の最も可能性の高いメカニズムは、不安定なC-末端トリメチルシリルエステルの形成を含み、このエステルは水またはアルコールの存在下で迅速に所望のC-末端カルボキシル基を再形成する。Fig. 3を参照すると、開裂反応に続くトリフルオロ酢酸(TFA)水溶液の使用を説明している。好ましくは、この工程におけるTFAの濃度は、約0.01ないし約0.2Mである。この段階でのTFAもしくは同等の酸の使用は開裂を著しく促進する。

【0021】この最も広い観点において、本発明は次式：



(式中、Rは約1~10の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、そしてXはアルカリ金属イオン、好ましくはナトリウムもしくはカリウムイオンである)で表される開裂剤を包含する。

【0022】本発明の広い観点には、アルキル基が1ないし約4個の炭素原子を有するトリメチルアミン・N-オキシドを包含する。トリエチル、トリアロピル、トリスプロピル、トリブチル、またはトリスブチルアミン・N-オキシドが使用可能である。それらの試薬は次式：



(式中、R₁は炭素数1ないし約4のアルキル基である)で表される。

【0023】適当な支持体には、活性化カルボン酸で修飾された非多孔質の好ましくはポリエチレンフィルムまたは膜が含まれる。C-末端配列決定のためのこの支持

体は、以後本明細書中で一般的にPE-COOHと記載するが、現存の支持体に比べて多くの利点を提供する。それらの利点には、(1) C-末端配列決定に採用される条件に対する支持体の安定性；(2) 表面基の親水性により、共有結合ポリペプチドサンプルに対する化学反応の実施において水性および有機性溶媒の両方が使用可能であること；(3) ポリペプチドを共有結合する能力が大きいこと(3.2nmole/mm²表面積)；(4) 配列決定に必要な支持体の都合よい寸法(1×5mm)が、出願人の自動化N-末端配列決定のための連続フローリアクターのものと似ていること；が含まれる。

【0024】本発明において支持体として有用なPE-COOHフィルムの厚みの範囲は、0.5ないし20ミル、典型的には1ミルである。このフィルムは非多孔質で天然状態では疎水性である。ポリエチレンフィルムからPE-COOHを製造する好ましい方法は米国特許4,339,473号に詳細に記載されており、その内容は本明細書に含まれるものとする。これらのPE-COOHフィルムは、30シー クリフ アベニュー、グレン コープ、ニューヨーク 11542のボール コーポレーション(Pall Corporation)から、PERMIONの商品名で市販されている。

【0025】PE-COOH、例えばボール コーポレーションの製品PERMIONをエステル誘導体の形成により活性化し、これにペプチドサンプルのN-末端をカップリングすることができる。適当な活性化試薬としては、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシートリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート(BOP)、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DICD)が含まれる。

【0026】一般に、PE-COOHの活性化は、適当な時間例えば約2時間、適当な溶媒中の活性化試薬の溶液との反応により、ほぼ室温で行われる。表1は例示である。

【0027】

【表1】

表 I

PE-COOHにカップリングしたロイシン エンケファリンの収率に及ぼす
種々のカップリング試薬および溶媒の影響

活性化 試薬	膜に共有結合した量 nmol (%収率)	
	50%アセトニトリル	50%DMF
DCC	0.2 (4.4)	1.8 (39.6)
CDI	0.07 (1.5)	0.23 (5.1)
EDC	0.32 (8.9)	0.12 (2.6)
BOP	0.58 (12.7)	0.29 (6.4)
DICD	0.68 (15.0)	0.57 (12.8)

DCC: 1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド

CDI: 1,1'-カルボニルジイミダゾール

EDC: 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド

塩酸塩

BOP: ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス(ジメチルアミノ)

ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート

DICD: 1,3-ジイソプロピルカルボジイミド

【0028】PE-COOHの片(1cm×0.1cm)を、一端を封止した1.5cmの連続フローリアクター(CFR)(シベリーら, 1987)に入れた。この膜を活性化試薬30μl(30mmol)と室温で30分間反応させた。全ての場合、使用した溶媒は100%DMFであるが、EDCを活性化試薬として用いたときは、水を溶媒とした。活性化反応の後、過剰の試薬を活性化反応に用いた溶媒(3ml)で洗い流した。次に各サンプルをアセトニトリル(1ml)で洗浄し、そして真空遠心で乾燥した。次に活性化した膜を、50%DMF水溶液もしくは50%アセトニトリル水溶液中のペプチド

(YGGFL)の30μl(4.54nmol)の溶液と、一方の端を封止したCFRリアクター中で16時間反応させた。膜を50%アセトニトリルまたは50%DMFで洗浄し、さらにアセトニトリルで洗浄し、そして真空遠心で乾燥した。カップリングしたペプチドの量を、誘導体化した膜をアミノ酸組成分析して決定した。

【0029】表IIはYGGFLの共有結合による付着収率に対する活性化時間およびカップリング時間の影響を示す。

【0030】

【表2】

表 II

YGGFLの共有結合による付着収率に対する活性化時間およびカップリング時間の影響

活性化時間 (hrs)	カップリング時間 (hrs)	カップリングした量 (nmol)	収率
0.5	1	0.54	4.0
0.5	2	2.11	15.6
0.5	4	3.33	24.7
0.5	20	5.19	38.4
1.0	1	1.01	7.5
1.0	2	1.59	11.8
1.0	4	2.73	20.2
1.0	20	5.57	41.3
2.0	1	2.44	18.1
2.0	2	2.45	18.1
2.0	4	5.25	38.9
2.0	20	7.2	53.3
4.0	1	0.52	3.9
4.0	2	0.52	3.9
4.0	4	3.4	25.2
4.0	20	4.1	30.4

【0031】これらの膜(1×12.5mm)を無水DMF中の過剰量のDCC(1g/1ml)により2時間活性化した。活性化反応の最後に過剰量の試薬を無水DMFで除去し、活性化された膜片を真空遠心で乾燥した。活性化膜の各々を、50%DMF水溶液中のロイシンエンケファリン溶液100μl(13.5nmol)を含有する連続フローリアクター(CFR)(シベリーら, Analytical Biochemistry(1987)163, 517-529)に入れ、指示した時間22℃に維持した。CFRの一方の端の細孔チューブを最初加熱し、次にプライヤーでひねって閉じた。カップリング反応の後、膜をカップリング溶媒、つづいてアセトニトリルでゆすぎ、真空遠心で乾燥した。共有結合でカップリングしたペプチドの量をアミノ酸分析で決定した。

【0032】多数のアミノ酸残基からなるペプチドのC-末端配列決定に好ましい、本発明の重要な観点は、一般式: $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (式中、nは4ないし10の数である)で表されるリンカーアームを、PE-COOHのカルボキシルに付加し、続いてペプチドサンプルをこのリンカーアームカルボキシルに共有結合させることを包含する。リンカーアームを使用する場合に、PE-COOHのカルボキシルを、好ましくは2-フルオロ-1-メチルピリジンで活性化して、リンカー分子との結合を促進する。一般に、ムカイヤマ, Ang

ewandteChemie 18:707-721(1979)を参照。リンカーカルボキシルは、PE-COOHカルボキシルについて記載したと同様の方法で活性化する。

【0033】実験法

材料: 無水酢酸はFisher Chemical Co. から購入した。トリメチルシリルイソチオシアネート(TMS-ITC)、無水ジメチルホルムアミド(DMF)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DIIC)、および1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)は、アルドリッチ(Aldrich)から購入した。水はミリポア(Millipore)のMilli Qシステムで精製した。この試験に用いた全てのポリペプチドはBachemまたはSigmaから購入した。1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)、およびトリエチルアミン(配列分析規格)はPierceから購入した。カルボン酸修飾ポリエチレン膜(PE-COOH)は、ボールコーポレーション(ロングアイランド, ニューヨーク)製を用いた。この試験で用いたアミノ酸チオヒダントインは、文献記載の方法で合成した(ベリリーおよびシベリー, Biochemistry

29:3145-3156 (1990)。

【0034】カルボン酸修飾PVDFへのペプチドの共有結合カップリング: PVDF-COOH (1cm×0.1cm) の片を連続フローリアクター (CFR) (シベリーら, *Analytical Biochemistry* (1987) 163, 517-529) に入れ、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 中の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 2μl (2mmol/ml) をハミルトンシリンジを用いて添加した。CFRの一方の端の細孔チューブを最初加熱し、次にプライヤーでひねって閉じた。このCFRを次に密閉したエッペンドルフチューブに入れた。2時間活性化 (25℃) した後、活性化膜を2mlのDMFでゆすぎ、そしてアルゴン気流中で乾燥した。乾燥膜上に、ロイシンエンケファリン (DMF中の14nmol/μl 溶液2μl) を注意深く重層して、一夜反応させた。この膜をメタノール (5ml) で洗浄し、そしてアルゴン気流中で乾燥した。カップリングしたペプチドの収率は、誘導体化膜を酸加水分解した後、アミノ酸組成分析で求めた。典型的収率は約50%であった。

【0035】カルボン酸修飾ポリエチレンへのペプチドの共有結合カップリング: PE-COOHの片 (1×12.5mm) を連続フローリアクター (CFR) (シベリーら, (1987) 上記) に入れ、無水DMF中の過剰量の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (1g/ml) で活性化した。CFRの一方の端の細孔チューブを最初加熱し、次にプライヤーでひねって閉じた。このCFRを次に密閉したエッペンドルフチューブに入れた。活性化反応の終了時に、過剰の試薬を無水DMFで洗浄して除き、そして真空遠心で乾燥した。各活性化膜を再度、目的ペプチド溶液を含む連続フローリアクター (CFR) (シベリーら, (1987) 上記) に入れ、22℃で一夜 (20時間) インキュベートした。用いたCFRの容量は100μlであった。カップリング反応の後、膜をカップリング溶媒とアセトニトリルでゆすぎ、真空遠心で乾燥した。

【0036】この新規開裂試薬を、メタノールとトープ

タノールの1:1溶液を溶媒として用いると、ポリエチレンまたはPVDF膜のような支持体に共有結合でカップリングしたいいくつかのペプチドの自動配列決定が可能であった。実施例は、ペプチドとしてKVILF、YGGFMRGL、YGGFLLおよびRGYALGについて示す。この場合、アルギニンのチオヒダントインが唯一の主要なバックグラウンドピークとして一緒に溶出される。メタノールとトープタノールの組み合わせが、開裂反応について好ましい溶媒である。本発明に有用な他のアルコール性溶媒には、1~6原子を有するアルカノール、例えばエタノール、イソプロパノール、2-トリメチルシリルエタノールおよびイソブタノールが含まれる。

【0037】C-末端配列発明の例示

ここに記載する実施例は、ホークら, *Anal. Biochem.* 147:315-330 (1985) の設計を基にして改変したN-末端配列決定装置を用いて、シベリーらの米国特許出願072,754に記載された連続フローリアクターを用いて、C-末端配列決定を行った例である。Fig. 9は全ての実施例の実施に用いた装置の模式図である。チオヒダントインアミノ酸の遊離は、オンライン接続したHPLCにより検出した。シベリーら, *Anal. Biochem.* 163:517-529 (1987) を参照。試薬および溶媒を供給するシステムは全てペルフルオロエラストマーを用いて製造した。米国特許4,530,586に一般的に記載されている、電磁的に作動するソレノイドを有しデッドボリュームがゼロの供給バルブをモジュラー方式で連結して、多インプットに対して単一アウトプットのラインを作成した。試薬と溶媒の流れをコントロールするバルブは、この化学反応に適するプログラムでコンピュータ操作した。表IIIはFig. 9に示され、そして実施例に記載する実験の実施に用いたC-末端配列決定装置のためのプログラムの概要である。

【0038】

【表3】

表 III
C-末端配列決定装置プログラムの概要

連続フローリアクター (CFR) (65℃)	コンバージョンフラスコ (CF) (55℃)	時間 (秒)
S 1 反応		120
S 1 反応		120
	R 4 リンス	120
乾燥	乾燥	100
R 1 反応		180
R 1 反応		450
S 4 リンス		60
R 1 反応		180
R 2 反応		450
S 4 リンス		60
R 1 反応		180
R 2 反応		450
S 4 リンス		60
R 1 反応		180
R 2 反応		450
S 4 リンス		120
S 2 リンス		60
S 4 リンス		120
S 3 リンス		120
S 4 リンス		120
R 3 反応		1200
R 3 から CF へ		45
R 3 反応	乾燥	240
R 3 反応	乾燥	240
S 2 供給		12
S 2 反応		120
S 2 から CF へ		45
S 2 供給		11
S 2 反応		120
S 2 から CF へ		45
	インジェクト	7
休止	休止	60

【0039】

試薬および溶媒の組成を表IVに示す。

【実施例】実施例1 PVDF-COOHに共有結合したロイシンエンケファリン(YGGFL) (1.2nmol) の配列決定

【0040】

【表4】

表 IV

試薬および溶媒の組成

R 1	無水酢酸
R 2	アセトニトリル中の30%TMS-ITC
R 3	2-トリメチルシリルエタノール中の0.05Mソジウム・トリメチルシリノレート
R 4	メタノール
S 1	アセトニトリル
S 2	水中の0.8%トリフルオロ酢酸
S 3	メタノール
S 4	-----

【0041】米国特許5,611,861に記載されていると理解される活性化PVDF-COOHは、ボールコーポレーションから入手した。チオヒダントインアミノ酸誘導体は逆相HPLCで分離した。この分離は、Beckman SystemGold上のPhenomenex Ultracarb 5 ODS (30) カ

ラム (2.0mm×25mm) により行い、Shimadzu (SPD-6A) 検出器で検出した。カラムを溶媒A (水中の0.1%トリフルオロ酢酸) で2分間溶出し、次に22℃において0.15ml/分の流速で溶媒B (水中の80%アセトニトリル, 10%メタノール) へ至る不連続勾配を適用した。使用した勾配は次のとおりであ

る：0%B 2分間、3分間かけて0-6%B、35分間かけて6-35%B、10分間かけて35-50%B、そして10分間かけて50-0%B。

【0042】Fig. 4は反応生成物のHPLC分析を示す。

実施例2 共有結合でPVDF-COOHにカップリングしたKVILF (1.2 nmol)の配列決定。
試薬及び溶媒の組成は表Vに示す。

【0043】

【表5】

表V	
試薬及び溶媒の組成	
R 1	無水酢酸
R 2	アセトニトリル中の30% TMS-ITC
R 3	メタノール中の0.05M ソジウム・トリメチルシラノレート
R 4	メタノール
S 1	アセトニトリル
S 2	水中の0.8%トリフルオロ酢酸
S 3	-----
S 4	-----

【0044】チオヒダントインアミノ酸誘導体は逆相HPLCで分離した。この分離は、島津SPD-6Aディテクターを用いて、ベックマン・システム・ゴールド (Beckman System Gold) 上のフェノメネックス・ウルトラカーブ (Phenomenex Ultracarb) 5 ODS (30) カラム (2.0mm×25mm) で行った。カラムを溶媒A (0.1%トリフルオロ酢酸水溶液) で2分間溶出し、続いて溶媒B (80%アセトニトリル、10%メタノール水溶液) への不連続勾配で22℃にて0.15ml/分の流速

で行った。用いた勾配は次のとおりである：0%B 2分間、3分間で0-6%B、35分間で6-35%B、10分間で35-50%B及び10分間で50-0%B。

【0045】Fig. 5は反応生成物のHPLC分析を示す。

実施例3 共有結合でポリエチレンにカップリングしたロイシンエンケファリン (YGGFL) の配列決定。
試薬と溶媒の組成を表VIに示す。

【0046】

【表6】

表VI	
試薬と溶媒の組成	
R 1	無水酢酸
R 2	アセトニトリル中の30% TMS-ITC (v/v)
R 3	50%メタノール、50%t-ブタノール中の0.01M ソジウム・トリメチルシラノレート
R 4	メタノール
S 1	5%トリエチルアミン水溶液
S 2	水中の1.0%トリフルオロ酢酸
S 3	50%メタノール、50%水
S 4	アセトニトリル

【0047】チオヒダントインアミノ酸誘導体は逆相HPLCで分離した。この分離は、島津SPD-6Aディテクターを用いて、ベックマン 126 ポンプ モジュール (Beckman 126 Pump Module) 上のフェノメネックス・ウルトラカーブ (Phenomenex Ultracarb) 5 ODS (30) カラム (2.0mm×25mm) で行った。カラムを溶媒A (0.006%リン酸、0.006%トリエチルアミン、0.045%ペンタンスルホン酸) で5分間溶出し、続いて溶媒B (0.03%リン酸、0.045%トリエチルアミン、30%アセトニトリル、0.045%ペンタンスルホン酸) への不連続勾配で22℃にて

0.15ml/分の流速で行った。用いた勾配は次のとおりである：0%B 5分間、7分間で0-20%B、25分間で20-100%B、100%B 23分間、2分間で100%-0%B。

【0048】Fig. 6は反応生成物のHPLC分析を示す。

実施例4 PE-COOHに共有結合でカップリングさせたRGYALG (8.1nmol) の配列決定。
RGYALGの配列決定は実施例3の記載と全く同様に行った。

【0049】Fig. 7にHPLC分析を示す。

実施例5 PE-COOHに共有結合でカップリングさ

せたYGGFMRGL (9.6nmol) の配列決定
YGGFMRGLの配列決定は実施例4の記載と全く同様にを行った。

【0050】 Fig. 8にHPLC分析を示す。

実施例6 リンカー11-アミノウンデカン酸 $H_2N(CH_2)_{10}CO_2H$ に共有結合でカップリングさせたYGGFL (3.7nmol) の配列決定

Fig. 9は、リンカー11-アミノウンデカン酸 $H_2N(CH_2)_{10}CO_2H$ に共有結合でカップリングさせたYGGFL (3.7nmol) の配列決定を示す。このリンカーは前記のとおり $PE-COOH$ のカルボキシル基をDCCで活性化して $PE-COOH$ に結合させた。結合の後、リンカーのカルボキシル基も同様にDCCで活性化し、次いでペプチドを共有結合で結合させた。リンカーの存在下でペプチドYGGFLを配列決定した場合は、6サイクルの配列決定の後に、N末端アミノ酸、Y、の50%が依然として共有結合していた (Fig. 6)。同じペプチドの配列決定を、上記リンカーへ結合した後に同じ配列決定プロトコルを用いて行くと (Fig. 10)、N末端アミノ酸、Y、の12%のみが依然として共有結合していた。

【0051】 YGGFLの配列決定は実施例3に記載したのと全く同様にを行った。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Fig. 1は、ソジウム・トリメチルシリノレート

の化学構造である。

の化学構造である。

【図3】 Fig. 3は、ソジウム・トリメチルシリノレートによる開裂反応と、開裂反応に続く水性酸例えばトリフルオロ酢酸 (TFA) の使用における、推定されるメカニズムである。

【図4】 Fig. 3Aは、開裂反応に続いてソジウム・トリメチルシリノレートを用いる類似のメカニズムを示す。

【図5】 Fig. 4は、PVDFに共有結合したロイシン-エンケファリン (YGGFL) の配列決定を示す。

【図6】 Fig. 5は、PVDF膜に共有結合したKVIILFのC-末端からの配列決定を示す。

【図7】 Fig. 6は、活性化 $PE-COOH$ 膜に共有結合したペプチド (YGGFL) のC-末端からの配列決定を示す。

【図8】 Fig. 7は、活性化 $PE-COOH$ 膜に共有結合したペプチド (RGYALG) のC-末端からの配列決定を示す。

【図9】 Fig. 8は、活性化 $PE-COOH$ 膜に共有結合したペプチド (YGGFMRGL) のC-末端からの配列決定を示す。

【図10】 Fig. 9は、リンカー11-アミノ・ウンデカン酸に共有結合したペプチド (YGGFL) のC-末端からの配列決定を示す。

【図11】 Fig. 10は、C-末端配列決定に用いられた装置の模式図である。

【図1】

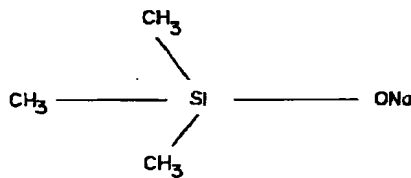
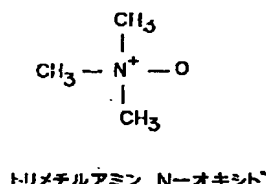


FIG. 1

【図2】



トリメチルアミン N-オキシド

FIG. 2

【図11】

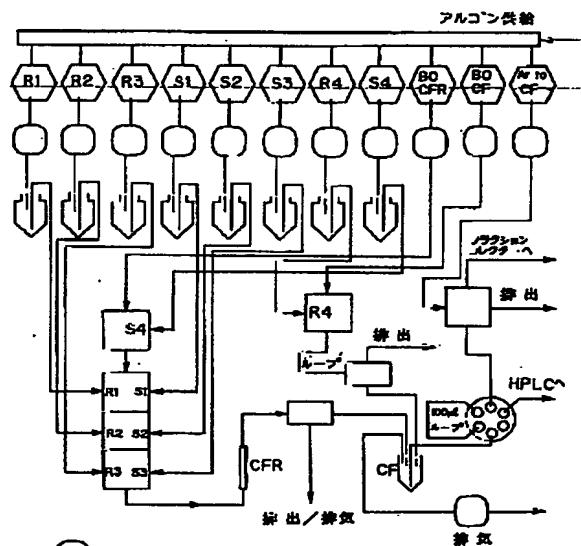


FIG. 10

【図4】

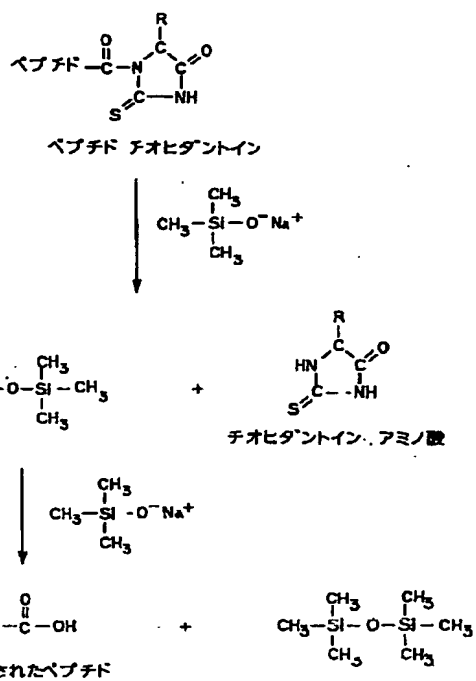


FIG. 3A

【図7】

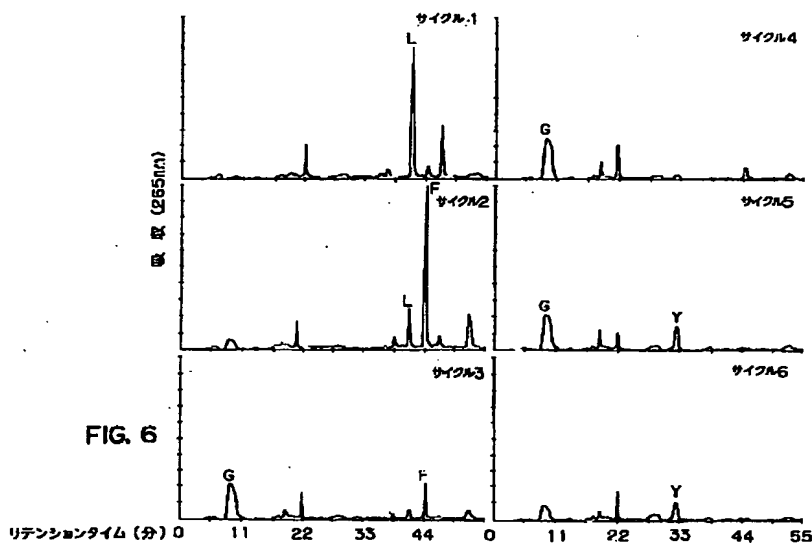


FIG. 4

【図6】

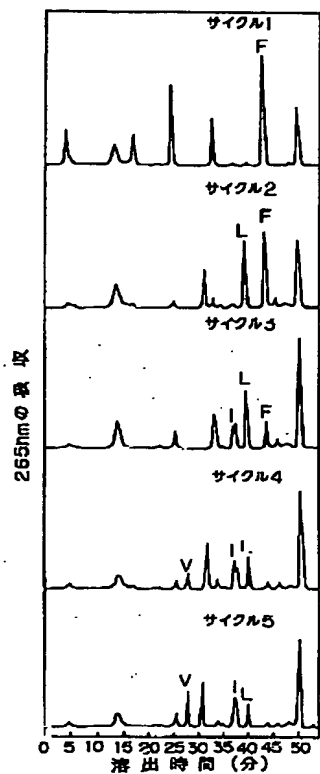


FIG. 5

【図8】

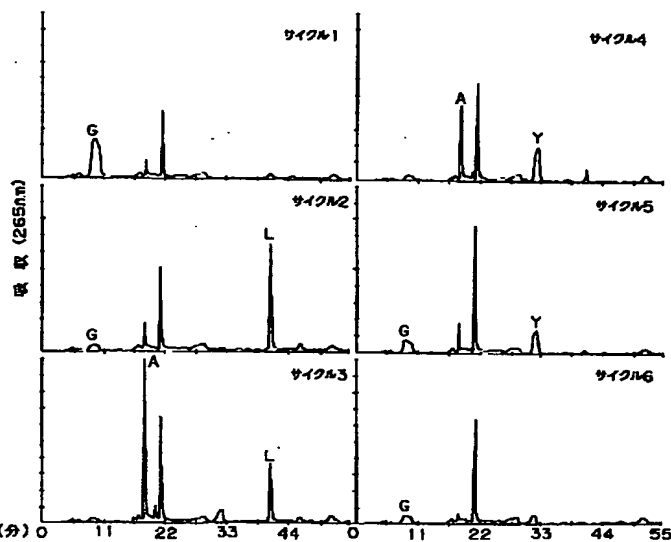


FIG. 7

【図9】

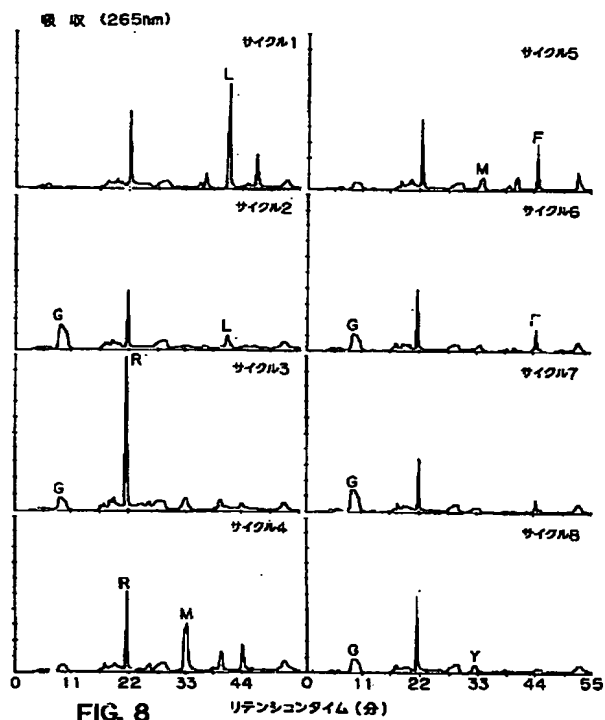
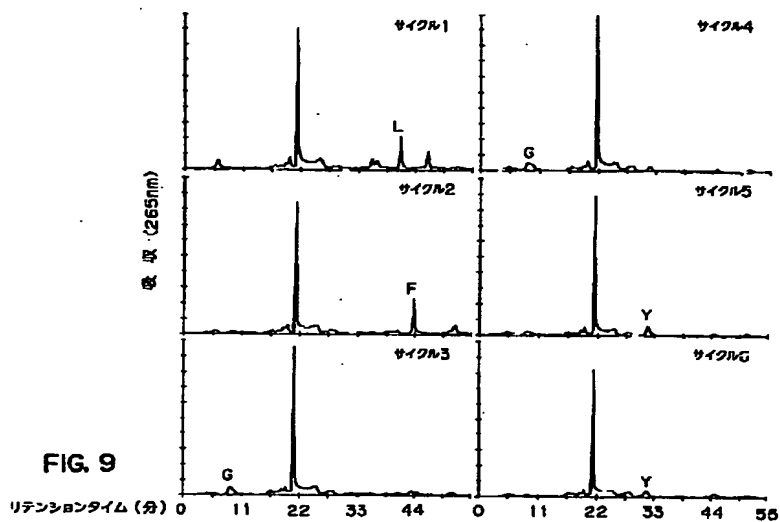


FIG. 8

【図10】



フロントページの続き

(71)出願人 598004424
1500 East, Duarte Roa
d, Duarte, California
91010-0269, United Stat
es of America